ÜBER MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DES MUSKELGLYKOGENS UND EINE NEUE ART SEINER FIXATION

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT ZU HEIDELBERG VORGELEGT
VON

PAUL NEUKIRCH
AUS FRANKFURT a. M.

BERLIN
DRUCK VON GEORG REIMER
1910

ÜBER MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DES MUSKELGLYKOGENS UND EINE NEUE ART SEINER FIXATION

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT ZU HEIDELBERG VORGELEGT
VON

PAUL NEUKIRCH
AUS FRANKFURT a. M.

BERLIN
DRUCK VON GEORG REIMER
1910

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg.

Referent: Professor Dr. Ernst.

1909. Dekan: Professor Dr. Menge.

Sonder-Abdruck aus Virchows Archiv Bd. 200.
Herausgegeben von Geh. Rat Prof. Dr. J. Orth.
Verlag von Georg Reimer, Berlin.

Ungezählt sind die physiologisch-chemischen Untersuchungen, die seit Claude Bernards großer Entdeckung über Glykogen angestellt worden sind, äußerst zahlreich auch die histologischen Arbeiten. Besonders ist die Leber seit jeher Gegenstand des Interesses gewesen, geringer ist die Zahl der Untersuchungen über das Glykogen des Muskels. Ganz überwiegend sind es hier Forschungen chemisch-physiologischer Art, die das Feld beherrschen; gering an Zahl nur sind die morphologischen Angaben.

So findet sich nach Claude Bernard [8] das Glykogen im embryonalen Säugetiermuskel anfangs in Körnerform („granulations"), später nur noch imbibiert („à l'état d'imbibition"). In Anbetracht der damaligen Methode geht aus dem Zusammenhang leicht hervor, daß unter „granulations" nur gröbere Partikel gemeint sein können. Barfurth [2] und Ehrlich [17] sahen das Muskelglykogen in der interfibrilären Substanz, Barfurth auch zuweilen in der Fibrille. Genauer einen morphologischen Zustand des Muskelglykogens zu erkennen, war mit den alten Jodmethoden nicht erreichtbar. Mit der für morphologische Zwecke weit überlegenen Best schen [11] Karminfärbung hat bisher Gierke [23] gearbeitet. Er schreibt vom Muskelglykogen: „Es ist mikroskopisch schlecht darstellbar und liegt in Form kleiner Körnchen an einer Faserreihe". Wohl die meisten Autoren, z. B. Ehrlich [17] und Marchand [34], nehmen an, daß das Muskelglykogen sich in einem diffus gelösten Zustand befindet.

Erst Arnold [2] gelang es, die Glykogenkörnchen des Muskels in einer Weise darzustellen, die an ihrem Zusammenhang mit den vital, supravital [3, 4] und z. B. mit der Retzius schen [43] Goldmethode darstellbaren Sarkosomen keinen Zweifel mehr läßt. Es sei erlaubt, die Arnold schen Leitsätze, die aus seinen Untersuchungen am Froschmuskel gewonnen wurden, hier wiederzugeben.

1. Das Glykogen ist in der quergestreiften Skelettmuskulatur des Frosches an die Sarkosomen gebunden, welche sowohl in longitudinaler Richtung entsprechend den interkolumnären Räumen angeordnet, als in transversaler Richtung J aufgelagert sind.

2. Je nach dem Gehalt an Glykogen erscheinen die Sarkosomen als diskrete Granula, oder aber es entstehen netzförmige Figuren, welche helle ungefärbte Felder Q einschließen. Die Breite der Netzbalken wechselt je nach dem Glykogengehalt, ebenso die Form der Maschen, je nachdem es in longitudinaler bzw. transversaler Richtung zur Glykogenablagerung gekommen ist oder nicht.
3. Unter dem Sarkolemma findet sich ein Netz, welches dem Sarkoplasma der peripheren Lagen entspricht. Ein kontinuierlicher Zusammenhang dieses peripheren Netzes mit dem außen das Sarkolemma umspinnenden besteht nicht. Auch eine kontinuierliche Beziehung zu Blut- und Lymphgefäßen, welch letztere manchmal Glykogen enthalten, ließ sich nicht nachweisen (Trophospongienlehre).
4. Die Muskelfibrillen enthalten kein Glykogen.

Nachdem durch Arnolds Forschungen das Muskelglykogen ein Objekt der Histologie geworden war, ergab sich die Frage nach dem Verhalten der Glykogengranula unter pathologischen Bedingungen. Von zwei Gesichtspunkten aus schienen derartige Untersuchungen aussichtsreich. Es konnte vermutet werden, die Morphologie werde unter pathologischen Bedingungen deutlicher hervortreten als unter normalen, wie vielfache Beispiele aus der pathologischen Anatomie zeigen. Andererseits konnten experimentell-pathologische Versuche eine Verbindung mit Resultaten der physiologischen Chemie herstellen.

Als Objekt wurde die Rana temporaria gewählt, an der Arnold seine Resultate gewann. Da die Versuche im Januar begannen, mußte berücksichtigt werden, daß nach einigen Autoren im Frühjahr beim Frosch eine starke Abnahme des Glykogens auftritt.

So schreibt Luchsinger[30]: „Aus dem Muskel schwindet das Glykogen im Winter schon nach wenigen Wochen, wenn nicht ganz, so doch bis auf äußerst geringe Spuren, was für Leber bekanntlich nicht gilt.“ Dagegen findet sich bei Dewèvre[16] folgende Stelle: „Im Anfang des Winters enthalten die Muskeln zweimal soviel Glykogen als im Sommer. Sicher ist auf jeden Fall, daß ein Teil des Muskelglykogens der Leber entstammt, da es sich ja noch vermehrt, wenn der Frosch seine Nahrungsaufnahme eingestellt und die Überwinterung begonnen hat. In dem Maße, in dem das Glykogen aus der Leber verschwindet, vermehrt es sich im Muskel. Im zweiten Abschnitt des Winterschlafes, wenn die Leber ihm kein Glykogen mehr liefert, sieht man das Muskelglykogen sich seinerseits vermindern, aber so langsam, daß man es noch im Augenblick des Erwachens vorfindet.“ Pflüger[42] und Athanasiu[6] fanden noch große Mengen Glykogen im Frosch am Ende des Winterschlafes. Auf die großen Unterschiede im Glykogengehalt der Frösche weist eine Arbeit von Mangold[22] hin.

Was meine Versuche betrifft, so fand sich bei den im Pathologischen Institut kühl in engen Behältern gehaltenen Winterfröschen bis in den Mai hinein stets reichliches Glykogen in Muskeln und Leber. Dagegen wiesen solche Frösche, die im Freien, in großen, viel Bewegung gestattenden Behältern gehalten wurden, im Frühjahr manchmal sehr wenig Glykogen auf. Im ganzen zeigte sich bei der Verwendung ruhig und kalt gehaltener Winterfrösche eine ziemliche Gleichmäßigkeit im Glykogengehalt der Muskeln, der bis in den Mai hinein zu morphologischen Studien genügte.

Untersucht wurden stets die Gastroknemii, Teile der Oberschenkelmuskulatur und die Leber. Die Methode bestand in der Fixation der lebensfrisch in gestreckter Stellung zusammengebundenen Schenkel in 96 proz. Alkohol; Ablösung der Muskeln nach 3 bis 4 Tagen, Einbettung in Zelloidin; Anfertigung von 10 μ dicken Längsschnitten durch den ganzen Muskel und mehrstündige Färbung in Best schem Kali-Karmin. Kontrollversuche mit Jodfärbung und Speichelprobe wurden häufig vorgenommen. Ganz regelmäßig zeigten die so behandelten Muskeln die von Arnold beschriebenen Granula, wenn auch stets nur stellenweise, soweit der durch den eindringenden Alkohol bewirkte Glykogentransport nicht eingetreten war. Größere Glykogenklumpen fanden sich ebenfalls in jedem Präparat. Gelang es aber nach einiger Übung, die durch die Alkoholfixation hervorgerufenen Kunstprodukte zu erkennen, so blieben in jedem Präparat genügend viel Stellen zum Studium der granulären Struktur übrig. Betrachtete man andererseits die Präparate ohne Rücksicht auf die Morphologie des Glykogens, so konnte man bei der stets gleichen Schnittrichtung und Dicke vergleichende Schlüsse über die Quantität des Glykogens in zwei entsprechenden Muskeln beider Seiten ziehen, jedenfalls besser als bei den früheren Jodmethoden. Die Leber wurde stets zum Vergleich mit untersucht. Daß die entsprechenden Muskeln beider Körperhälften sich etwa in ihrem Glykogengehalt unterscheiden sollten, war a priori nicht anzunehmen. Übrigens sind Versuche, die den Glykogengehalt entsprechender beiderseitiger Muskeln an Warm- und Kaltblütern als annähernd gleich ergaben, in E. Külz Laboratorium von Cramer[15] angestellt worden.

Einige Vorversuche ergaben, daß entsprechende Muskeln beider Seiten, was den Glykogengehalt betrifft, stets einander vollkommen äquivalente Bilder boten. Es wurde nunmehr zur ersten Versuchsreihe geschritten, zur

Untersuchung des Glykogens im Muskel nach Durchschneidung des zugehörigen Nerven.

Bei einer Reihe von 17 Temporarien wurde der linke Nervus ischiadicus innerhalb des Beckens freigelegt und durchtrennt. Die Frösche wurden in

kurzen Abständen getötet, und zwar der erste am dritten, der letzte am 23. Tage nach der Nervendurchschneidung. Da die Frösche bei sehr niederer Temperatur in engen Behältern gehalten wurden, so war der etwaige Glykogenverlust in dem nicht gelähmten Schenkel durch Arbeitsleistung auf ein Minimum beschränkt. Es ergab sich, daß sowohl morphologisch als grob quantitativ bis zum 20. Tag jede deutliche Veränderung ausblieb. Vom 20. Tag an dagegen fand sich in dem gelähmten Gastroknemius eine weitgehende Vermehrung der Muskelkerne, die stellenweise mitten in der Faser in der Längsrichtung reihenförmig zu zehn und zwölfen aneinander liegen. In den so veränderten Muskelfasern liegt das Glykogen sonst in der normalen granulären Struktur in den interkolumnären Räumen und entsprechend der isotropen Substanz. Die gewucherten Kerne liegen in einer Sarkoplasmasäule vom Durchmesser der Kerne, welche oft scharf umschriebene Glykogengranula einschließt.

Die weitestgehenden Veränderungen zeigt der Gastroknemius des 23 Tage post op. getöteten Frosches. Auch hier besteht eine, wenn auch geringere Kernvermehrung. Dagegen haben einige Faserzüge vollkommen die Querstreifung eingebüßt, die Längsstreifung ist undeutlich, die gesamte Masse des Muskels hat ein krümeliges Aussehen. Die Kerne sind rundlich, unregelmäßig geformt. In dem Karminpräparat fehlt an dieser Stelle jede positive Glykogenfärbung, während Nachbarfasern reichlich Glykogengranula enthalten.

Ein Schwund des Glykogens ist also erst in dem Augenblicke nachweisbar, in dem die Querstreifung zerstört ist. Selbst degenerative Veränderungen, die sich durch Kernvermehrung ausdrücken, lassen das Muskelglykogen augenscheinlich noch unverändert. Demnach beeinflußt die Nervendurchschneidung beim Frosch das morphologisch darstellbare Glykogen nicht mehr als die übrigen Elemente der Faser.

Die Versuchsreihe bildet eine Ergänzung zu chemischen Versuchen, wie sie Chandelon[14] am Kaninchen durchführte. Er fand nach der Durchschneidung der Beinnerven mehr Glykogen in dem gelähmten, als in dem Kontrollschenkel. Manché[33] prüfte nach und wies darauf hin, daß die scheinbare Vermehrung in dem gelähmten Schenkel als Verminderung in dem beweglichen Bein zu deuten sein könne.

Während Chandelon und Manché also die alte Angabe Claude Bernards[9] bestätigt haben, daß gelähmte Muskeln des Warmblüters sich durch höheren Glykogengehalt vom nicht gelähmten unterscheiden, geht aus der morphologischen Untersuchung am Winterfrosch hervor, daß gröbere quantitative Veränderungen des Muskelglykogens noch 20 Tage nach der Nervendurchschneidung fehlen. Erst mit dem Eintritt degenerativer Veränderungen, die sich durch Schwund der Querstreifung ausdrücken, tritt ein Schwinden des Glykogens zutage. Eine Ver-

mehrung unter diesen Umständen wurde nie beobachtet. Die Zunahme des Glykogens im gelähmten Warmblütermuskel darf demnach nicht als Ausdruck der Degeneration gedeutet werden, sondern sie ist zu erklären aus dem durch die Lähmung bedingten Mißverhältnis zwischen Glykogenbildung und Glykogenabbau. (Siehe unten.)

Chandelon hat beim Kaninchen den Glykogengehalt der Muskeln auch nach Arterienunterbindung untersucht und eine Verminderung konstatiert. Dieser Versuch gab zu einem analogen am Frosche Anlaß. Es wurde zwei Temporarien die Arteria femoralis einseitig unterbunden, und der Muskel nach acht Tagen untersucht. Es waren keinerlei histologische Veränderungen gegenüber dem Kontrollschenkel eingetreten, weder in bezug auf die kontraktile Substanz, noch auf Glykogen und Sarkoplasma. Es hatte der Lymphstrom wohl allein zur Aufrechterhaltung des trägen Wínterstoffwechsels genügt.

Um im Muskel Ernährungsstörungen hervorzubringen, wurden bei einer Reihe von Temporarien um den linken Oberschenkel Leinenbändchen verschieden fest angezogen, und danach an der Schwimmhaut der Kreislauf unter dem Mikroskop kontrolliert; der andere Schenkel blieb zur Kontrolle frei.

Bei einzelnen besonders fest umschnürten Schenkeln war keine Zirkulation mehr sichtbar, bei einer anderen Gruppe bot sich das Bild der venösen Stase, wieder andere zeigten Hyperämie der Kapillaren und verlangsamten Abfluß des Blutes durch die stark erweiterten Venen. Sämtliche Frösche wurden nach einer Woche getötet und fixiert. — Ein eigenartiges Bild bietet der total abgeschnürte Muskel: Die Querstreifung ist verschwunden, die Längsstreifung noch deutlich. Erythrozyten sind nicht mehr vorhanden, aber überall in den Lymphräumen liegen dichtgedrängt Rundzellen mit noch gut gefärbten Kernen, die nur als Leukozyten angesprochen werden können. Von Glykogen ist keine Spur mehr zu entdecken. — Der einfach gestaute Muskel bietet außer einigen Blutextravasaten keinen Unterschied gegenüber dem entsprechenden der gesunden Seite. Bedeutend sind die histologischen Veränderungen in dem bis zur Stase gestauten Gastroknemius: Alle Interstitien sind mit Blut angefüllt, die Primitivfibrillenbündel des bereits makroskopisch auf das Doppelte angeschwollenen Muskels sind auseinandergetrieben. Aber die Querstreifung ist deutlich, und an vielen Stellen finden sich ganz besonders schöne, stark lichtbrechende Granula in der isotropen Substanz. Da, wo das Sarkoplasma sehr stark aufgequollen ist, findet sich auffallend viel diffus gefärbtes Glykogen. Aber aller Wahrscheinlichkeit nach dürfte diese schlechte Konservierung der Glykogen-

struktur durch ungünstige Fixationsbedingungen in dem wasserreichen Gewebe bedingt sein.

Auch hier ein ähnliches Ergebnis wie bei der Nervendurchschneidung: Veränderungen, die die Muskelfaser in ihrem Aufbau aus quergestreifter kontraktiler Substanz und Sarkoplasma intakt lassen, bringen auch in das Bild der Arnold schen Granula keinen Wechsel. In diesem Zusammenhange sei erwähnt, daß Claude Bernard[10] den embryonalen Muskel glykogenfrei fand, so lange er noch keine quergestreifte Struktur besitzt.

Für den innigen Zusammenhang des Muskelglykogens mit der Substanz des Muskels spricht auch die Tatsache, daß es bisher nicht gelungen ist, die Muskulatur eines normal genährten Tieres für die chemische Untersuchung durch Muskelarbeit glykogenfrei zu machen, während dies für die Leber mit keinen Schwierigkeiten verbunden ist.

So tetanisierten Weiss[47], Marcuse[35] und Manché[33] Froschschenkel bis zur Erschöpfung. Bei Marcuse nahm der Glykogengehalt des Schenkels bei Reizung mit dem faradischen Strom durchschnittlich von 0,65 % auf 0,43 % ab, eine Änderung, die mikroskopisch nur wenig zum Ausdruck kommen dürfte. Külz[20] ließ einen Hund angestrengte Arbeit leisten und berichtete: „Während wir in der angestrengten Bewegung ein mächtiges Mittel besitzen, das den Glykogengehalt der Leber in wenigen Stunden sicherer auf ein Minimum zu reduzieren vermag, als eine 20 tägige Karenz und selbst dann seine Wirkung nicht versagt, wenn es sich um sehr schwere und sehr gut genährte Tiere handelt, weist der Glykogenbestand der Muskulatur unter demselben Einfluß noch sehr bedeutende Zahlen auf."

Um das Verhalten der Glykogengranula im Muskel unter Beobachtung seines Zusammenhangs mit dem Leberglykogen bei großer Arbeitsleistung zu erkennen, wurde Fröschen 0,05 bis 0,12 mg Strychnin nitr. in den Bauchlymphsack injiziert, nachdem vorher der linke N. ischiad. durchschnitten worden war. Sobald der Krampfzustand in Lähmung übergegangen war, was etwa nach 12—36 Stunden eintrat, wurden Leber und Schenkelmuskeln untersucht. In einigen Fällen wurde die Leber gänzlich glykogenfrei, sonst meist äußerst glykogenarm befunden. Niemals wurde die gereizte Muskulatur dagegen glykogenfrei. Distinkte Granula waren, oft etwas blaß gefärbt, stets nachweisbar, wenn auch die Gesamtmenge des Glykogens der des normalen Froschmuskels der Jahreszeit nachstand. Kaum ein Zweifel kann

aber darüber walten, daß der gelähmte Schenkel des tetanisierten Frosches einen großen Reichtum an stark gefärbten Glykogengranula und Netzen aufwies in einer Fülle und Ausdehnung, wie sie bei anderen Fröschen selten zu beobachten war.

Um den Einwurf auszuschalten, die Leber der Strychninfrösche sei bereits vor dem Versuch aus irgendwelchen Ursachen glykogenfrei oder -arm gewesen, wurde bei einem Frosch nach Ischiadikusdurchschneidung der Lobus dexter und medius der Leber abgebunden und entfernt, darauf dem Tier Strychnin injiziert und die vorher exstirpierten Leberlappen mit dem während des Tetanus zurückgelassenen verglichen. Der mittlere und rechte Lappen erwiesen sich als äußerst glykogenreich, dagegen bot der zurückgelassene Lobus sinister ein eigentümliches Bild: die der Abschnürungsstelle naheliegenden Partien weisen starke Quetschung der Zellen auf. In ihnen liegt Glykogen, aber auch extrazellulär liegen große, wohl ausgepreßte Glykogenschollen, dagegen sind peripher gelegene Partien, die normale Zellbilder bieten, ganz glykogenfrei. Nach R. Külz'[25] und Cramers[15] chemischen Untersuchungen liegt das Glykogen mindestens in der Säugetierleber gleichmäßig verteilt, und auch in meinen Präparaten sind nie glykogenfreie Stellen in glykogenreichen Lebern aufgetreten. So kann der Befund nur derart gedeutet werden, daß im Tetanus die funktionsfähigen, mit Zirkulation versorgten Leberzellen in dem zurückgelassenen Lobus sinister ihr Glykogen unter dem mächtigen Reiz des Tetanus abgebaut haben. Bei zwei tetanisierten Tieren, deren Leber glykogenfrei bzw. sehr glykogenarm war, wurden die auf der Höhe der Spermatogenese stehenden Testikel untersucht und glykogenhaltig gefunden. Auch dies ein Zeichen der verschiedenartigen Bindung des Glykogens im Organismus.

Das Resultat der Versuchsreihe war demnach: Konstantes vermindertes Vorhandensein der Granula auch im tetanisierten Muskel. Besonders reichliche und schöne Glykogenstruktur im gelähmten Muskel des tetanisierten Tieres. Daß letzterer aus den der Leber entstammenden gewaltigen Zuckermengen (es kommt beim Strychnin-Tetanus selbst zur Glykosurie) Glykogen aufbaut, ohne es wie der tetanisierte Muskel verwerten zu können, ist sehr wahrscheinlich; jedenfalls kann diese Frage nur quantitativ chemisch entschieden werden. Daß der Muskel selbständig Glykogen

bilden kann, hat E. Külz[27] an entleberten Fröschen, denen er Traubenzucker injizierte, bewiesen. Dasselbe hat De Filippi[20] an Hunden mit Eckscher Fistel gezeigt.

Es blieb noch der Versuch, die Muskulatur entleberter Frösche durch Strychnintetanus glykogenfrei zu machen. Leider sagten die Versuche wenig aus: Beim entleberten Frosch tritt das Lähmungsstadium schon bei kleinen Strychningaben so schnell auf, daß man eine vollkommene Zerstörung des Glykogens im kurzen Verlauf des Krampfes nicht erwarten darf. Versuche mit anderen Krampfmitteln sollen noch angestellt werden.

Die Pharmakologen erklären die rasch lähmende Wirkung des Strychnins in befriedigender Weise durch den Fortfall der entgiftenden Lebertätigkeit, wie aus Rothberger und Winterbergs[44] Arbeit hervorgeht. An eine Lähmung infolge des Mangels an Kohlehydratzufuhr aus der Leber braucht man infolgedessen nicht zu denken.

Auffallend war bei den Strychninversuchen, daß auch dann, wenn keine Spur von Leberglykogen mehr vorhanden war, die Muskulatur doch niemals glykogenfrei befunden wurde, oder besser ausgedrückt, es nie an nach Best färbbaren Granula fehlte. Zweifellos befindet sich das Glykogen des Muskels, mindestens aber das der Sarkosomen in höchst eigenartig gebundener Form. Wie ist es zu erklären, daß nach Külz die Muskulatur des hungernden Hundes leicht glykogenarm wird, während es nicht gelingt, sie durch Arbeit frei zu machen? Wie kommt es, daß ganz entsprechend man gelegentlich schlecht genährte Frösche fast ohne jedes Muskelglykogen findet, während der Tetanus, der genügt, um alles Leberglykogen zum Schwinden zu bringen, scharf betonte, mit Best karmin färbbare Granula übrig läßt? Die Erklärung der letzten Tatsache kann darin gesucht werden, daß hier die Best sche Färbung einen gesteigerten Funktionszustand zur Anschauung bringt, indem der der Leber entstammende Blutzucker in den Sarkosomen unter vorübergehender Glykogenbildung dem Stoffwechsel des arbeitenden Muskels dienstbar gemacht wird. Es sind die Sarkosomen nicht nur Depots, sondern mehr noch Stätten des regsten Stoffumsatzes.

Die Anhäufung von Glykogen in den Sarkosomen der gelähmten Extremität des Strychninfrosches kann im Sinne einer

Glykogenstauung erklärt werden, die bei abnorm reichlicher Zuckerzufuhr und vollkommener Muskelruhe eintritt.

Wie schon oben erwähnt, wurde bei allen Versuchen die Alkoholfixation angewandt, und alle von Arnold beschriebenen Formen der Glykogengranula konnten im Verlauf der an etwa 40 Fröschen angestellten Versuche beobachtet werden. An vielen Stellen waren in jedem Präparat sehr feine zierliche Bilder zu beobachten, wie sie Arnold auch abgebildet hat, und doch wollte es nicht gelingen, das gesamte Glykogen ohne die von Fichera und Gierke näher studierte Ausschwemmung und teilweise Verlagerung im ganzen Präparat zur Anschauung zu bringen. Es galt daher eine bessere, mindestens eine meinen Zwecken entsprechendere Fixationsmethode zu finden. Zunächst wurde versucht, das Eiweiß des Muskels zur Gerinnung zu bringen, ehe die Verlagerung des Glykogens eingetreten sein konnte. Ich fixierte daher Muskeln in 96prozentigem Alkohol, der auf 70° zuvor erwärmt worden war. Der Erfolg war gering: Die Verlagerung trat doch auf, große Strecken des Muskels zeigten diffuse Färbung, der morphologische Befund war weniger gut als an den kalt fixierten Präparaten. Ferner wurde versucht, einem Frosch vom Herzen aus Alkohol absolutus zu injizieren, in der Annahme, es werde infolge des allseitig eindringenden Alkohols keine einseitige Verlagerung des Glykogens in der Zelle hervorgebracht. Der Versuch stieß infolge der Zerreißlichkeit der Gefäße auf Schwierigkeiten. Die Fixation gelang nur bei der Leber. Im Schnitt zeigte sich, daß das Glykogen nicht wie sonst nach einer Seite, sondern nach mehreren an Kapillaren grenzenden Seiten verlagert wurde.

Nun wurde versucht, den Alkohol aus der Methode nach Möglichkeit ganz auszuschalten; die Anregung zu einem neuen Weg gab mir die Lektüre der Külzschen Arbeit über die selbständige Bildung von Glykogen im Muskel des entleberten Frosches bei Injektion von Traubenzuckerlösung. Es kam mir die Vorstellung, es möge ein genügender Zusatz von Dextrose, als einem Spaltungsprodukt des Glykogens, zu einem der üblichen wässerigen Fixationsmittel die Spaltung des Glykogens in Traubenzucker verhindern, ähnlich wie die Gegenwart von viel Peptonen die Spaltung des Eiweißes durch Salzsäurepepsin verhindert, ferner konnte eine ge-

ringere Löslichkeit des Glykogens als solchen in dem syrupähnlichen Medium erwartet werden, wie es mit allerdings schon fixiertem Glykogen bei der Ehrlichschen Jodgummimethode der Fall ist. Es wurden Versuche angestellt, und die bereits im „Zentralblatt für allgem. Pathologie und pathologische Anatomie“ [36] angegebene Methode erwies sich als brauchbar. Sie soll kurz nochmals angegeben werden.

I. Methode zur Fixation des Muskelglykogens.

1. Kleine Muskelbündel werden in natürlichem Spannungszustand auf Hölzchen gebunden und 6 bis 12 Stunden in mit Dextrose gesättigtem konzentriertem wässrigem Sublimat fixiert;
2. darauf bis zu 6 Stunden in mit Dextrose gesättigten 30 % Alkohol verbracht, dem Jodtinktur zugesetzt werden kann;
3. 24 Stunden oder länger in zu wechselndem 96 proz. Alkohol eingelegt. Darauf
4. Zelloidineinbettung, Herstellung 6 bis 8 μ dicker Schnitte, Färbung mit Bests [11] Kalikarmin mindestens 1 bis 3 Stunden.

IIa. Methode, zur morphologischen Darstellung des Leberglykogens geeignet.

1. Fixation etwa 6 bis 16 Stunden in mit Dextrose gesättigtem 40 proz. Formaldehyd;
2. Übertragung in 80 proz. Dextrose gesättigten Alkohol, weiter nach I.

IIb. Gefriermethode zur Orientierung geeignet.

Aus der Dextroseformaldehydlösung können Stücke kurz in gesättigte wässrige Dextroselösung gebracht werden. Sie werden auf dem Gefriermikrotom geschnitten und ohne Vorfärbung nach Best gefärbt. Kurze Vorfärbung ist möglich in mit Dextrose versetztem Hämatoxylin-Delafield.

Nachdem eine morphologisch brauchbare Methode gefunden war, galt es nachzuprüfen, ob die Ausgangshypothese der Wahrheit nahekomme, oder ob die Wirkung der Dextrose anders zu erklären sei. Zunächst schien sicher, daß der postmortale Glykogenschwund durch zweierlei bedingt sein kann, durch Lösung des Glykogens oder durch Abbau zu Zucker.

Was die Möglichkeit der Lösung betrifft, so ist nach Z. Gatin-Gružewska [22] das Glykogen in physikalischem Sinne nahezu oder ganz unlöslich. Es diffundiert nicht durch tierische Membranen und wird nach Gatin-Gružewska vom galvanischen Strom an die Anode transportiert, ist also ein richtiges Kolloid.

Da bei dieser Annahme das Glykogen durch Zellwände und namentlich Sarkolemm nicht diffundieren kann, so muß es, falls es sich noch in Lösung befindet, sich auch mit Jod oder Best-karmin innerhalb der Zelle resp. des Sarkolemmschlauches nachweisen lassen (cf. Best)[12]. Wird das Glykogen zu Dextrose gespalten, so entzieht es sich dem histologischen Nachweis[1]). Diese Spaltung geht vor sich durch das in der Leberzelle enthaltene diastatische Ferment. Über dies Ferment findet sich nicht allzuviel in der Literatur:

v. Wittich[48] wies nach, daß es nicht aus dem Blut stamme, sondern der Leberzelle angehöre. Pavy[39] fixierte Leber in Alkohol; wurde derartiges Material dann wieder mit Wasser digeriert, so trat stets die Diastasenwirkung wieder auf. Der Versuch zeigt, daß die Alkoholfixation das diastatische Ferment nicht zerstört, sondern nur unwirksam macht. Pavys[39 40] Gegner, Foster[21] und Paton[37 38] nahmen an, die Glykogenspaltung sei eine Lebensfunktion der Zelle, die diastatische Wirkung des in Alkohol fixierten Organs sei durch Bakterienwirkung vorgetäuscht. Salkowsky[45] zeigte, daß gekochte Leber keine diastatische Wirkung mehr habe, dagegen das mit Chloroform behandelte Organ wohl. Bakterienwachstum wird aber durch Chloroform aufgehoben.

Da demnach das Vorhandensein eines vom Leben der Zelle unabhängigen diastatischen Ferments gesichert scheint, so muß man sich zunächst die Frage stellen: Wie verhalten sich die üblichen Fixationsmittel zu diesem Ferment?

Aus Pavys Versuch geht hervor, daß das Ferment in Alkohol unwirksam, aber nicht zerstört wird. Daß der Alkohol den Abbau des Glykogens verhindert, ist sicher. Sein Verhalten zum Lösungszustand dagegen ist besonders von Ehrlich[17] dargestellt worden. Er schreibt von der Fixation des Glykogens: „Es entstehen nun die Kugeln, die am Härtungspräparat so scharf hervortreten, zweifellos in der Art, daß während der vorbereitenden Prozesse im Zellplasma, das wohl einen biologisch, nicht aber chemisch einheitlichen Körper darstellt, ein Teil seiner Bestandteile vor anderen

[1]) Folgende weitere Möglichkeit kommt hier kaum in Betracht: Nach Kato[25] kommt im Froschovarium chemisch nachweisbares Glykogen histologisch (Jodmethode) nicht ohne weiteres zur Anschauung, weil es sich in einer unfärbbaren höheren Verbindung befindet.

einer Art Gerinnung oder Koagulation anheimfällt. Durch die hierbei stattfindende Kontraktion werden nun zunächst die flüssig resp. zähflüssig bleibenden Substanzen in Form von Kugeln innerhalb des Zelleibes ausgepreßt und als solche später durch die Einwirkung des absoluten Alkohols in ihm fixiert."

Daß hierbei Verlagerungen auftreten oder ausbleiben können, daß morphologisch erhaltenes und Kunstprodukte sich dicht zusammenvorfinden, ist erklärlich.

Fixiert man mit Sublimat oder Formol, so verläßt insbesondere das labile Muskelglykogen seinen Ort und wird innerhalb des Sarkolemmschlauches je nach der Richtung der Diffusionsströme transportiert. Es erscheint als ganz diffuse Wolke im gefärbten Präparat, meistens auf einer Seite der Faser. Der Abbau wird demnach durch Sublimat wenigstens einigermaßen gehindert, die „Lösung" dagegen geht unbeschränkt vor sich. Setzt man zu den beiden erwähnten Fixationsmitteln Dextrose bis zur Sättigung, so findet kein Transport des Glykogens mehr statt. Verdünnt man die Mischung wieder etwa mit dem gleichen Volumen des reinen Fixationsmittels, so macht sich wieder ein mehr oder weniger großer Glykogentransport bemerkbar. Sicher liegt demnach ein Einfluß der Dextrose auf die „Lösung" des Glykogens vor.

Ein einfacher Versuch bestätigt das: Gibt man zu gesättigter Dextroselösung und zu Aqua destillata im Reagenzglas die gleiche Menge chemisch reinen Glykogens, so tritt die kolloidale Lösung in der Dextrose um ein vielfaches langsamer auf als im Wasser. Allerdings zeigen konzentrierte Lävulose und arabischer Gummi etwa dieselbe Verzögerung der Glykogenauflösung. Sicher liegt demnach ein Einfluß der Dextrose auf die „Löslichkeit" des Glykogens vor.

Wie aber verhält sich die Dextrose zum Abbau des Glykogens durch das Ferment? Die Frage ist schwer zu beantworten. Zunächst wurde ein Frosch durch Strychnin glykogenarm gemacht und gleichzeitig hierdurch die Glykogen abbauende Funktion seiner Leberzelle gesteigert, wie aus Langendorfs[29] Strychnindiabetesversuchen am Winterfrosch hervorgeht. Ein Stück A wurde in Dextrose + Formol fixiert, ein zweites B in Alkohol, das dritte C wurde auf 6 Stunden in eine 10prozentige Dextroselösung gebracht, dann wie A fixiert. A und B enthielten mittelviel Glykogen im

Parenchym und den Kupfer schen Zellen. Dagegen war C fast glykogenfrei, nur wenige Leberzellen und viele Kupfer sche Sternzellen enthielten noch Glykogen. Demnach läßt sich auf diese Weise ein Einfluß der Dextrose für sich auf den Abbau des Glykogens nicht nachweisen, das Wahrscheinlichste ist allerdings, daß die Dextrose überhaupt nicht in die noch lebenden Zellen eindringen konnte, und so die Glykolyse ungehindert vor sich ging.

Da Lävulose sich im Reagenzglas zur Lösung des Glykogens ähnlich verhält wie Dextrose, so wurden Versuche auch mit diesem Zucker unternommen. Bot er doch den Vorteil, sich bei 96° in einen nicht mehr auskrystallisierenden Syrup zu verwandeln und dazu sich in Alkohol leichter zu lösen als Dextrose. Es wurden Experimente mit verschieden konzentrierten Mischungen in Verbindung mit Formol und Sublimat angestellt. Fast alle Resultate zweier paralleler Versuchsreihen fielen ungünstig aus. Gut wurde nur die Fixation des Muskels in einer Mischung von einem Teil Sublimat und einem Teil Lävulosesyrup. Im übrigen schien, entweder infolge des zu langsamen Eindringens der Lävulose-Mischungen oder aus Gründen, die in den noch unbekannten Beziehungen der Monosaccharide zum Glykogen liegen, ein erheblicher Glykogenschwund stattgefundenzu haben. Obwohl Zufälligkeiten bei dem nur einmal wiederholtenVersuch mitspielen konnten, mußte man doch an eine spezifische Wirkung der Dextrose auf das diastatische Ferment denken, die der Lävulose fehlt. Trotzdem es sicher ist, daß in Gegenwart von Formol oder Sublimat und Dextrose ein nachweislicher Glykogenabbau nicht stattfindet, wurde nach einem weiteren stark wirkenden Antifermentativum gesucht. Auf Anraten des Herrn Dr. Plenge wurden einige Fixationen unter Zusatz von Zyankalium zum Fixationsmittel vorgenommen. Sie ergaben keinen Unterschied gegenüber den ohne Zusatz fixierten Präparaten. In einem weiteren Versuch wurde bei einem Frosch der linke Schenkel fest abgeschnürt, das Tier dann durch eine Injektion von Zyankali getötet und dann Leber und Muskelstückchen in Gemischen von 1. Sublimat + Dextrose, 2. dextrosegesättigtem Sublimat + dem gleichen Volumen konzentriertem Sublimat, 3. Formol + Dextrose und 4. Alkohol fixiert. Sämtliche Methoden lieferten brauchbare morphologische Resultate, nur bei 2 und 4 war eine Glykogenverlagerung vorhanden. Aber es lieferte die abgebundene

zyankalifreie Extremität ebenso gute Bilder, wie die übrige Muskulatur. Trotzdem somit die Zyankaliversuche kein greifbares Resultat ergaben, wird es noch notwendig sein, die verschiedenen Zellgifte, vor allem wohl Formol, Sublimat und Zyankali, auf ihre Einwirkung auf das diastatische Ferment der Leber zu untersuchen. Es wird sich ihre antifermentative Wirkung mittels Durchspülung des überlebenden Organs mit dünnen Lösungen und anschließender Prüfung der Glykolyse vielleicht aufklären lassen. Auf ähnliche Weise, wenn auch sicher schwieriger, wird sich der möglicherweise vorhandene Unterschied zwischen Dextrose und Lävulose in ihrer Beziehung zum Glykogen erklären lassen.

Zur Technik der Methode glaube ich folgende Punkte hervorheben zu dürfen:

1. Die Fixation daure nicht länger als 12 Stunden.
2. Es sind nur kleinere Stücke zu verwenden [1]).
3. Die Einbettung in Zelloidin geschehe möglichst sorgfältig. Die Dextrosepräparate sind dann von vorzüglicher Schnittfähigkeit.
4. Die Schnitte sollten nicht über 8 μ dick sein.
5. Rauhe Oberfläche der Schnitte infolge eines nicht tadellosen Messers führt leicht zu mangelhafter Färbung.
6. Es kann unreine (technische) Dextrose verwendet werden (zehnmal billiger als chemisch reine).
7. Die angegebenen Mischungen können besonders für etwas größere Objekte mit bis zu höchstens dem halben Volumen des reinen Fixationsmittels versetzt werden. Doch tritt dann leicht Verlagerung auf.

Einige Bemerkungen zur Morphologie, wie sie sich mit der Dextrose-Sublimat-Methode darstellt, seien gestattet:

Die von Arnold beschriebenen Verschiedenheiten im Aufbau des Glykogens sind wohl zum Teil bewirkt durch den quantitativ verschiedenen Glykogengehalt; eine äußerst wichtige Rolle spielt aber auch der Kontraktionszustand. Am regelmäßigsten erhält man die Granula in gedehntem Zustand des Muskels. Sie liegen dann in zwei Reihen entsprechend J und lassen die Z entsprechenden Stellen frei. Ist der Muskel mäßig kontrahiert, so fließen beide Reihen zusammen und der ungefärbte Raum für Z verschwindet. Bei manchen Zuständen des Tonus scheinen die Querreihen zu verschwinden, indem die Granula in der Längsrichtung sich nähern und in verschiedene Querebenen rücken;

[1]) Kleine Stücke sind auch bei der Alkoholfixation vorzuziehen.

infolgedessen wird nunmehr die Längsanordnung in den interkolumnären Räumen deutlich, während die J entsprechenden Querreihen unkenntlich werden. Netze entstehen durch Aneinanderreihen der Granula in Längs- und Querrichtung. Die Querschnitte entsprechen den von Arnold beschriebenen Bildern.

Zusammenfassung.

I. Bei allen Eingriffen, die zu regressiven Prozessen im Muskel des Winterfrosches führen, ist das Glykogen ebenso lange und nur so lange nachweisbar, als die normale Querstreifung erkenntlich ist; ohne diese gibt es in der Muskelfaser kein Glykogen.

II. Durch Strychnintetanus ist die Färbbarkeit der Sarkosomen nach Best nicht zum Schwinden zu bringen. In der gelähmten Extremität eines tetanisierten Tieres sind die Glykogengranula deutlicher als normal.

III. Anstatt mit Alkohol kann man das Muskelglykogen mittelst stark mit Dextrose versetzter wässeriger Fixationsmittel morphologisch darstellen. Mit Formol-Dextrosegemisch erzielt man auch gute morphologische Fixation des Leberglykogens [5]. Die Verlagerung des Glykogens ist auf ein Minimum beschränkt.

Anhang.

Um die neuen Fixationsmethoden zu erproben, wurden sie auch auf von Warmblütern stammendes Material angewandt:

So wurden Stücke des Septum interventriculare eines Kalbsherzens zum Teil mit Alkohol, teils mit Formol-Dextrose (Methode II a), teils mit Sublimat-Dextrose (Methode I) fixiert. Während in Alkoholpräparaten nun der reiche Glykogengehalt der Purkinjeschen Fasern vollkommen verlagert liegt, ist die Verteilung des Glykogens dieser sarkoplasmareichen Gebilde in den Dextrosepräparaten vollkommen gleichmäßig. Wie in den Herzmuskelfasern, so liegt auch in den Purkinjeschen Fasern das Glykogen in einer Anordnung granulärer Längs- und Querreihen, ganz ähnlich wie im quergestreiften Skelettmuskel. Die kontraktilen Fibrillen sind glykogenfrei. — Das beste Resultat ergab die Behandlung nach II a.

Es wurde ferner eine menschliche Leber untersucht. Wenige Stunden nach der Sektion war der Glykogengehalt nach der Gefriermethode II b festgestellt. Nach I und II a kam das Glykogen in feingranulärer Form ohne wesentliche Verlagerung zur Darstellung. Besonders distinkte Granula enthielten die nach I behandelten Präparate. — Als pathologisches Material wurde ein Stück einer Diabetikerniere fixiert. Morphologische Unterschiede gegenüber Alkoholpräparaten ergaben die Dextroseschnitte hier nicht, dagegen

traten in der Fixation des Protoplasmas alle Vorzüge der Sublimat- und Formolfixation vor der Alkoholbehandlung zutage.

Als angemessene Methode zur Fixation etwas größerer Stücke sei Methode II a empfohlen, dagegen liefert die etwas schwierigere Methode I bei gutem Gelingen besonders distinkte Bilder.

Zum Schlusse sei es mir vergönnt, meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Paul Ernst für die Anregung zu dieser Arbeit und Herrn Dr. P. Schneider für seinen freundlichen Rat meinen Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

1. Abderhalden, Lehrbuch der physiol. Chemie 1909. — 2. Arnold, Zur Morphologie des Muskelglykogens und zur Struktur der quergestreiften Muskelfaser. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 73, 1909 (Lit.). — 3. Derselbe, Über die Abscheidung des indigschwefelsauren Natrons im Muskelgewebe. Virch. Arch. Bd. 71, 1878. — 4. Derselbe, Über vitale Granulafärbung in den Knorpelzellen, Muskelfasern und Ganglienzellen. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 55, 1901. — 5. Derselbe, Virch. Arch. Bd. 193, 1908. — 6. Athanasiu, Verteilung des Glykogens. Pflügers Arch. Bd. 74, S. 561. — 7. Barfurth, Arch. f. mikr. Anat. Bd. 25, 1885 (Lit.). — 8. Bernard, Cl., Cts. rend. vol. 75, p. 78/79. — 9. Derselbe, Leçons sur le diabète, p. 553, 1873 — 10. Derselbe, Journal de physiol. t. 2, 1859, p. 333, 334. — 11. Best, Karminfärbung des Glykogens und der Kerne. Ztschr. f. wissensch. Mikrosk. Bd. 23, 1906. — 12. Derselbe, Zieglers Beitr. Bd. 33, S. 589. — 13. Bleibtreu, Pflügers Arch. 1909, Bd. 127. — 14. Chandelon, Pflügers Arch. Bd. 13, p. 626. — 15. Cramer, Pflügers Arch. Bd. 24, S. 70 und S. 85. — 16. Dewèvre, Cts. rend. 9. série, 4, 1892. — 17. Ehrlich (bei Frerichs), Ztschr. f. klin. Med. VI, 1883, S. 44 u. S. 39 Anm. — 18. Fichera, Zieglers Beitr. Bd. 36, 1904 (Lit.). — 19. Fiessinger, Cts. rend. 1909, Bd. 66, Nr. 4. — 20. Filippi, Ztschr. f. Biol. Bd. 50. — 21. Foster, Textbook of Physiol. (zit. nach Pflüger Bd. 96, S. 299). — 22. Gatin-Gruzewska, Pflügers Arch. Bd. 103, S. 282 u. 286. — 23. Gierke, Zieglers Beitr. Bd. 37, 1905, S. 520. — 24. Derselbe, Lubarsch-Ostertag, 11, II, 1907 (Lit.). — 25. Kato, Pflügers Arch. 1909, Bd. 127, S. 130. — 26. E. Külz, Beiträge zur Kenntnis des Glykogen. Marburg 1891, S. 41. — 27. Derselbe, Pflügers Arch. Bd. 24, S. 64. — 28. R. Külz, Ztschr. f. Biol. Bd. 22, 1886, S. 183. — 29. Langendorf, Engelmanns Arch. Suppl. 1886, S. 269. — 30. Luchsinger, Diss. Zürich 1875. — 31. Derselbe, Pflügers Arch. Bd. 18, 1878. — 32. Mangold, Pflügers Arch. Bd. 121, 1908. — 33. Manché, Ztschr. f. Biol. Bd. 25, 1889, S. 163. — 34. Marchand, Virch. Arch. Bd. 100 S. 59. — 35. Marcuse, Pflügers Arch. Bd. 39, S. 425. — 36. Neukirch, Ztlbl. f. allg. Path. u. path. Anat. Nr. 12, 1909. — 37. Paton, Transaction of the royal. soc. 1894. Nach Pflügers Arch. Bd. 96, S. 299. — 38. Derselbe, Phil. Transaction vol. 185 b, p. 233. Nach Pflügers Arch. Bd. 96, S. 299. — 39. Pavy, The Physiol. of the Carboh. 136 ff. (1894). Nach Pflügers Arch. Bd. 96, S. 299. — 40. Derselbe, The Physiol. of the Carboh. An Epicriticism, p. 74,95. Nach Pflügers Arch. Bd. 96, S. 299. — 41. Pflüger, Pflügers Arch. Bd. 96 (Lit.). — 42. Derselbe, Pflügers Arch. Bd. 71, S. 316. — 43. Retzius, Zur Kenntnis der quergestreiften Muskelfaser. Biol. Unters. 1881. — 44. Rothberger und Winterberg, Arch. intern. de Pharmakodynamie Bd. 15, S. 339. — 45. Salkowsky, D. med. Wschr. Nr. 16, 1888. — 46. Derselbe, Pflügers Arch. Bd. 56, S. 352. — 47. Weiss, Sitzungsber. d. Wien. Akad. Bd. 64, Abs. 1. — 48. v. Wittich, Pflügers Arch. Bd. 73.

Lebenslauf.

Ich, Paul Richard Neukirch, lutherischer Konfession, wurde am 26. Dezember 1885 als Sohn des Justizrats Dr. Adolf Neukirch, weiland Rechtsanwalt und Notar, zu Frankfurt a. M. geboren. Von Ostern 1895 bis Ostern 1904 besuchte ich das Goethegymnasium daselbst, das ich mit dem Zeugnis der Reife verließ. Im Sommersemester 1904 bezog ich die Universität Freiburg i. B. Im Herbst 1904 ging ich nach Berlin und studierte dort weitere sechs Semester Medizin. Von Ostern 1908 bis Herbst 1909 studierte ich in Heidelberg, wo ich am 26. November 1909 die ärztliche Hauptprüfung bestand.